

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE BURDA FARIAS

**VALIDAÇÃO INTERNA DO CONJUNTO COMERCIAL DE AMPLIFICAÇÃO DE
MARCADORES STRs AUTOSSÔMICOS (GlobalFiler™) PARA USO NO
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR FORENSE DA POLÍCIA
CIENTÍFICA DO PARANÁ**

CURITIBA

2018

ALINE BURDA FARIAS

**VALIDAÇÃO INTERNA DO CONJUNTO COMERCIAL DE AMPLIFICAÇÃO DE
MARCADORES STRs AUTOSSÔMICOS (GlobalFiler™) PARA USO NO
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR FORENSE DA POLÍCIA
CIENTÍFICA DO PARANÁ**

Monografia apresentada como requisito à
obtenção da graduação no curso de Ciências
Biológicas, Departamento de Genética,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Danielle Malheiros
Ferreira

Coorientador: Dr. Marcelo Malaghini

CURITIBA

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço por cada oportunidade colocada por Deus em minha vida, através do estudo, consegui entrar na faculdade dos meus sonhos no curso que tanto queria.

Agradeço a Deus pela família na qual me colocou, onde recebi afeto, carinho, atenção, suporte físico, emocional e espiritual.

Aos meus pais Adilson e Denize pelo amor incondicional, por todas as manhãs acordando mais cedo para preparar café, pelas caronas, por todas as vezes que precisaram sair tarde da noite para me buscar na faculdade, por estarem com os braços sempre prontos para me abraçar.

À minha irmã Mariana, que suportou dormir várias madrugadas com as luzes acesas para que eu pudesse fazer meus trabalhos ou estudar para as provas. Por todas as conversas, brincadeiras e amor.

Ao meu noivo, e muito em breve marido, Thiago, que sempre esteve aguentando minhas reclamações e estresses, me ajudando com abraços fortes. Sempre disposto a me ajudar com os estudos (mesmo não entendendo nada da área), e pela paciência nos momentos de desespero e por seu amor por mim.

À minha orientadora Dr. Danielle, que me ajudou em todos os processos, me ensinou sobre organização, competência e comprometimento.

Ao Dr. Marcelo por abrir as portas para o estágio na Polícia Científica onde eu mais desejava trabalhar. Local em que descobri um amor ainda maior pela biologia molecular e pesquisas da área forense.

Aos peritos criminais Leonardo, Marianna, Claudia, Luciellen e Chris por tantos ensinamentos passados, pela dedicação ao trabalho, pelo carinho com o qual fui recebida e por cada uma das minhas milhares de perguntas respondidas.

RESUMO

Em laboratórios de genética molecular forense, amostras provenientes de cenas de crime são processadas, extraídas, amplificadas, genotipadas e analisadas, a padronização interna reflete em resultados de perfis de DNA juridicamente aceitos e inquestionáveis, além de garantir a qualidade dos perfis inseridos na Rede Integrada de Banco de Perfis Genéticos. Com os avanços tecnológicos, foram desenvolvidos sistemas comerciais com iniciadores de reação capazes de amplificar um número cada vez maior de regiões polimórficas simultaneamente. O sistema comercial GlobalFiler™ (ThermoFisher Scientific) é um conjunto de reagentes utilizado para a amplificação de 24 locos STRs de DNA autossômico humano. Recentemente, esse sistema comercial foi empregado no Laboratório de Genética Molecular Forense da Polícia Científica do Paraná e, por esse motivo, se torna necessário um estudo de validação interna. A validação deve ser realizada quando um novo método ou sistema comercial é implantado em um laboratório, com a finalidade de padronizar a performance dos procedimentos laboratoriais, gerando confiabilidade e eficiência nas análises realizadas pelos peritos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi definir um limiar analítico de detecção de picos de fluorescência gerados nos eletroferogramas para o sistema GlobalFiler™, que permita a separação de ruídos basais do equipamento daqueles que são os picos reais que devem ser utilizados na determinação dos perfis genéticos. Para o estudo de sensibilidade foram utilizadas três amostras não-probatórias e conhecidas, além de controles negativos para avaliar o limiar analítico em amostras com poucas concentrações de DNA. O método utilizado nas análises estatísticas foi o de Kaiser (1970). As amostras foram quantificadas por PCR quantitativo em tempo real com o estabelecimento de oito pontos de diluição que foram genotipadas em triplicata por eletroforese capilar. Os resultados indicaram valores de altura de picos de RFU diferente para cada canal de fluorescência: $SID^{TM} = 42,18$; $FAM^{TM} = 38,12$; $VIC^{TM} = 46,65$; $NED^{TM} = 36,06$ e $TAZ^{TM} = 40,86$. Foi possível verificar que há diferença nos valores entre os cálculos com as diluições de DNA e os cálculos realizados com o controle negativo. Um fator importante observado nos resultados realizados com a diluição seriada, foi que a concentração de DNA altera o ruído basal e, como consequência, altera os valores de limiares. Portanto, neste trabalho definiu-se o valor de limiar analítico, definido em altura de pico de RFU, que melhor se encaixa nas necessidades do Laboratório de Genética Molecular Forense da Polícia Científica do Paraná, para cada um dos cinco canais de fluorescências analisados, garantindo dessa forma, a veracidade dos perfis genéticos originados na rotina do laboratório.

Palavras-chave: perfis genéticos; validação interna; STRs

ABSTRACT

In forensics sciences DNA laboratories, samples from crime scenes are processed, extracted, amplified, genotyped and analysed. The standardization reflects in DNA profiles that are legally credited and unquestionable, in addition, it is a warranty in the quality of the DNA profile to be inserted in the Integrated Gene Profile Bank Network (Rede Integrada de Banco de Perfil Genético). With the technology advances, the commercial kits are able amplify polymorphic sites of the DNA. The GlobalFiler™ Amplification Kit (ThermoFisher Scientific) is a reagents set that is used to amplify 24 locos specific to human autosomal DNA that amplifies short tandem repeats sequences (STRs) simultaneously. The kit is recently being used in the Forensic Molecular Genetics Laboratory from Scientific Police of Paraná. When a new method or commercial supplies are implemented in a laboratory, an internal validation must be performed with the intent of standardize the procedures in the laboratory, bringing reliability and efficiency on data analysis. In a forensics science laboratory, the standardization reflects in DNA profiles that are legally credited and unquestionable, in addition, it is a warranty in the quality of the DNA profile to be inserted in the Integrated Gene Profile Bank Network (Rede Integrada de Banco de Perfil Genético). The validation studies, includes sensibility of detection analysis, analytical and stochastic threshold and, for these analysis, three non-probative and known samples were used in this study. The samples were quantified on a real-time PCR system and eight dilution points were established to be able to perform a capillary gel. The statistical methods used in this study, was based in Kaiser (1970) The results showed that RFU peaks vary for each fluorescent channels: $SID^{TM} = 42,18$; $FAM^{TM} = 38,12$; $VIC^{TM} = 46,65$; $NED^{TM} = 36,06$ e $TAZ^{TM} = 40,86$. Different data values were observed between the experiments with the DNA dilution and with the negative control. An interesting fact in the results with the serial dilution was the relation with concentration of DNA, more DNA concentrations disturbs the basal noise and consequently, it affects the thresholds values. The analytical threshold was defined in the present study for each one of the five fluorescence channels in a way that fits in the casework of the Forensic Molecular Genetics Laboratory from Scientific Police of Paraná, giving a warrant in their genetic profiling.

Key words: genetic profile; internal validation; STRs

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 HISTÓRICO	8
2.2 PERFIS GENÉTICOS E OS POLIMORFISMOS	10
2.3 PCR EM TEMPO REAL	13
2.4 GLOBALFILER™	14
2.5 BANCOS DE DADOS DE PERFIS GENÉTICOS	15
2.6 ANÁLISE DE DNA E DEGRADAÇÃO	15
2.7 QUALITY ASSURANCE STANDARDS	17
2.8 VALIDAÇÃO INTERNA	18
2.9 OBJETIVOS	19
2.9.1 OBJETIVOS GERAIS	19
2.9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 METODOLOGIA	20
3.1 AMOSTRAS	20
3.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA	20
3.3 AMPLIFICAÇÃO	21
3.4 ELETROFORESE CAPILAR	21
3.5 MÉTODO PARA DETERMINAR O LIMAR ANALÍTICO	22
4 RESULTADOS	23
5 CONCLUSÕES	24

1 INTRODUÇÃO

Uma das primeiras publicações que trata a molécula de DNA como transmissora dos traços hereditários, foi escrita por Haeckel em 1866, logo após os estudos de hereditariedade realizados por Mendel com o modelo das ervilhas (1866), gerando muita curiosidade e estudos a respeito desta molécula. Em 1869, Friedrich Miescher isolou o material a partir dos linfócitos de pus proveniente de ferimentos cirúrgicos enquanto buscava determinar a composição química dos componentes celulares. Em 1953, James Watson e Francis Crick, ficaram conhecidos pelo artigo publicado na revista *Nature* em que descrevem a estrutura da molécula de DNA (WATSON E CRICK, 1953).

Por estar presente em quase todos os tecidos humanos, o DNA pode ser utilizado como fonte de prova, incontestável, por ser possível a detecção de material genético nas cenas de crime contido em diversos materiais biológicos, tais como manchas de sangue, saliva ou sêmen, compondo assim, a genética forense, área da genética voltada para o auxílio da justiça (CORTE-REAL et al., 2015).

Os materiais biológicos são coletados em ambientes expostos à ação climática, de fungos, calor, radiação solar, bactérias e, por esse motivo, é muito frequente que as amostras já tenham passado por processos de degradação, o que afeta significativamente a análise dos dados de genótipos. Ademais, outra variável que pode ocorrer nas amostras, é a presença de inibidores da enzima DNA polimerase impossibilitando a amplificação por reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* ou PCR) (FRANCISCHINI et al., 2013).

As amostras que constituem a casuística de um laboratório de genética forense, após serem coletadas e enviadas ao laboratório para análise, são processadas, extraídas, amplificadas, genotipadas e analisadas. Os vestígios coletados em exames de corpo delito, tais como manchas de sangue e sêmen são comumente utilizados para investigar a participação de um indivíduo em um crime sexual. Outro tipo de amostra forense muito frequente são fragmentos ósseos ou tecidos provenientes de cadáveres sem identificação, para posterior confronto com amostras referência de sangue fornecidos por supostos familiares da vítima a fim de identificar cadáveres. Também pode-se encontrar como vestígios: unhas, cabelos, urina, bituca de cigarro, impressões digitais, cartucho de armas de fogo deflagrados,

entre outros que são utilizados em exames de verossimilhança. Desde a coleta, armazenamento, processamento e análise de amostras, deve-se haver padronização, além de cadeia de custódia documentada, de maneira que resultem em dados e perfis de DNA que sejam juridicamente aceitos e inquestionáveis como prova (BUTLER, 2005).

O sistema comercial (Kit) GlobalFiler™ (ThermoFisher Scientific) é composto por um conjunto de reagentes utilizados para a amplificação de amostras de DNA por PCR, dispõe de iniciadores de reação (*primers*) específicos para o DNA autossômico humano e, recentemente, foi empregado no Laboratório de Genética Molecular Forense da Polícia Científica do Paraná (LGMF). Este sistema comercial permite a amplificação simultânea, em uma única reação de PCR, de vinte e uma sequências curtas em tandem (STRs), localizados em cromossomos autossômicos, um STR de cromossomo Y, e um marcador de inserção/deleção (InDel) de cromossomo Y, além do gene da amelogenina, perfazendo um total de vinte e quatro marcadores genéticos distintos (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016).

Atuando em conjunto, outra prática comumente usada em laboratórios de genética molecular forense, é a inserção de perfis genéticos na Rede Integrada de Banco de Perfil Genético (RIBPG). A RIBPG tem como objetivo, o intercâmbio de perfis genéticos de interesse da justiça. E entre as principais competências da gestão do RIBPG, está a padronização dos procedimentos e técnicas de análise, inclusão e armazenamento de perfis nos bancos de dados (RIBPG, 2015).

Os perfis genéticos são, portanto, utilizados para identificação humana e usados como provas judiciais para incriminar ou inocentar, por essa razão, precisam ser gerados perfis de altíssima confiabilidade. Para tanto sempre que um sistema novo começa a ser utilizado precisa ser validado seguindo normas internacionais (SWGDAM, 2012). A validação inclui determinação de tamanho de picos nos eletroferogramas, para que picos falsos não sejam incluídos como verdadeiros, gerando perfis errados.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi definir um limiar de detecção de picos de fluorescência para o sistema comercial utilizado pelo Laboratório de Genética Molecular Forense da Polícia Científica do Paraná, que permita a separação de ruídos basais do equipamento daqueles que são os picos reais que devem ser utilizados na determinação dos perfis genéticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Em 1900, Karl Landsteiner demonstrou a distinção de grupos sanguíneos entre os indivíduos através do sistema ABO, e em 1915, um livro foi publicado por Leone Lattes descrevendo um caso de paternidade que foi solucionado a partir da técnica de diferenciação do grupo sanguíneo. As técnicas sorológicas foram de grande utilidade, porém eram limitadas por necessitarem de grandes quantidades de material, que muitas vezes são escassos quando se trata de cenas de crime (GOODWIN, et.al., 2007).

Frederick Sanger e colaboradores, na década de 70, desenvolveram a técnicas de sequenciamento de DNA em gel de poliacrilamida desnaturante, possibilitando a análise da sequência de DNA. Através da técnica *Southern blotting*, polimorfismos de DNA foram observados e, em 1978, a primeira análise de uma região altamente polimórfica no gene da β -globina foi documentada (GOODWIN, et.al., 2007).

Um artigo de Jeffreys e colaboradores publicado em 1985 na revista *Nature*, demonstrou pela primeira vez a técnica de DNA *fingerprinting* (de perfis de DNA) com a perspectiva de utilização em casos forenses. Foi realizado um estudo em que foi observado que as regiões do DNA com sequências altamente repetitivas com variáveis repetições em tandem, chamadas de minissatélites, eram capazes de diferenciar indivíduos e após um ano de sua publicação, o primeiro caso criminal foi solucionado a partir da tipagem de DNA. Colin Pitchfork foi preso após o confronto genético de seu sangue com o sêmen presente no corpo de duas meninas que foram encontradas mortas na Inglaterra, através do resultado de inclusão de verossimilhança (WAMBAUGH, 1989 citado por BUTLER, 2010).

Em 1986, Mullis e colaboradores, publicaram um estudo em que demonstram um processo capaz de aumentar a quantidade de DNA presente em uma amostra. Através de cópias de uma sequência alvo no DNA genômico, delimitada por iniciadores de reação, tornou-se possível a detecção de quantidades mínimas de DNA na amostra. A técnica recebeu o nome de reação em cadeia da polimerase, ou PCR (do inglês = *polymerase chain reaction*).

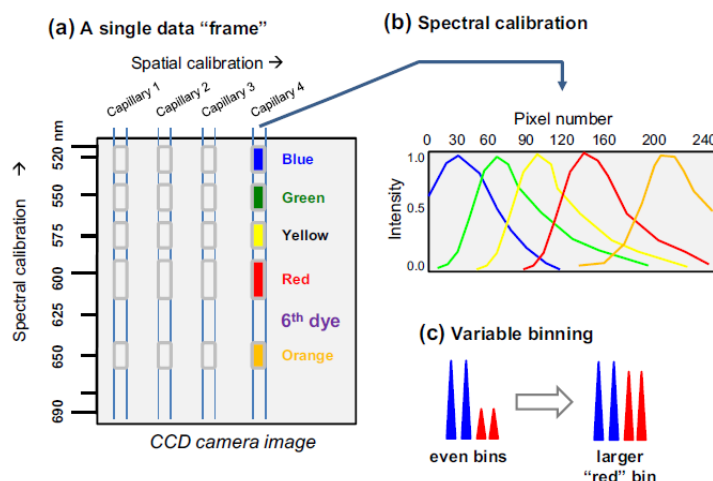
Os avanços das pesquisas moleculares resultaram em técnicas avançadas de identificação de material genético, permitindo conclusões precisas e irrefutáveis a respeito da genética individual. Segundo Varuzza (2013), em 1998 foi o lançamento do primeiro sequenciador de eletroforese capilar, o ABI 3700, dando continuidade ao processo de automação dos sequenciamentos que começou em 1986 com o ABI 370.

Um equipamento de eletroforese capilar é composto basicamente por um capilar preenchido por polímero, uma fonte de tampão, um suprimento de energia, laser excitatório, detector de fluorescência e um computador para controlar a detecção e injeção de amostras. Como em uma eletroforese de gel, as moléculas de DNA carregadas negativamente migram pelo polímero do capilar em direção ao pólo positivo. As moléculas maiores, se movem mais lentamente que as menores, permitindo a separação das moléculas por diferenças de tamanho. Na preparação para a eletroforese, junto com as amostras de DNA, é adicionado um padrão de tamanhos moleculares (*size standard*), que são fragmentos de DNA conhecidos que permitem a correlação entre os tamanhos dos fragmentos das amostras (BUTLER, 2012).

A detecção é realizada a partir de medições entre os tempos de injeção das amostras e tempo de detecção pelo *laser* localizado ao final do capilar. Os fragmentos são excitados à medida que passam pelo *laser*, as moléculas menores são mais rápidas e passam pelo feixe antes que as moléculas maiores, relacionando a velocidade com o tamanho do fragmento ou número de pares de base. A detecção dos fragmentos é representada por um eletroferograma em função da intensidade de fluorescência observada pela emissão de fluoróforos (FIGURA 1). Os fragmentos de mesmo tamanho e com mesmo tempo de migração no capilar são diferenciados no eletroferograma pela cor detectada do fluoróforo ligado aos *primers* da reação (BUTLER, 2012).

O sinal de intensidade relativa da câmera de detecção da fluorescência emitida com a excitação dos fluoróforos inseridos pela reação de PCR é convertido para Unidades de Fluorescência Relativa (RFU, do inglês *Relative Fluorescence Unit*) com valores definidos por algoritmos e analisadas no *Software* Gene Mapper ID-X 1.4 (Applied Biosystems) através de picos de intensidade de fluorescência (BUTLER, 2015).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA SEPARAÇÃO DOS SINAIS DETECTADOS EM UMA ELETROFORESE CAPILAR.



LEGENDA: (a) Representação de uma imagem da câmera de detecção com milhões de pixels fotossensíveis que são capazes de converter um fóton em um elétron. A luz visível é gerada pelos fluoróforos ligados aos *primers* que são excitados pelo *laser* e com uma calibração de espectro com filtros é possível definir as posições dos fluoróforos no eixo Y. (b) Imagem representativa da sobreposição dos fluoróforos, o resultado é melhorado com o auxílio do *Software DataCollection 3.1* (ThermoFisher Scientific) que cria um algoritmo capaz de interpretar os resultados. (c) Os tamanhos variáveis dos picos é reflexo da diferença de detecção de sinal no eixo Y da imagem da câmera.

2.2 PERFIS GENÉTICOS E OS POLIMORFISMOS

O DNA nuclear é o alvo principal da genética forense, possuindo regiões codificantes e não codificantes. As regiões codificantes possuem sequências de DNA para produção de proteína, e as não codificantes possuem, em sua maior parte, sequências curtas e repetitivas. Dentro das regiões não codificantes estão as sequências polimórficas, alvos utilizados na pesquisa forense (GOODWIN et al., 2007; BUTLER, 2011).

Localizadas em sua maior parte entre genes, existem porções do DNA que se repetem em tandem, ou seja, em sequência (STR, do inglês, *Short Tandem Repeats*). Essas sequências repetitivas são polialélicas e polimórficas e, em geral diferem de indivíduo para indivíduo através de diferenças no número de

nucleotídeos da sequência ou no número de vezes que a sequência se repete (BUTLER, 2012).

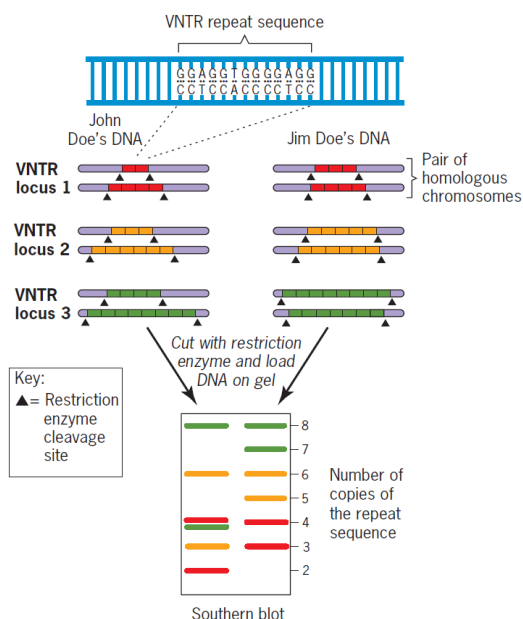
Por muitos anos, os perfis de DNA foram originados por uma técnica chamada de *Southern blot*, em que o DNA era clivado com enzimas de restrição específicas e hibridizado com sondas apropriadas, específicas para regiões repetitivas (FIGURA 2) (GOODWIN, et.al., 2007). Com os avanços nas pesquisas acerca da genética molecular, os perfis genéticos hoje, são representados por um conjunto de genótipos revelados pela análise de eletroferogramas. Utilizam-se *primers* conjugados a fluorescências para amplificar os segmentos de interesse, e através de eletroforese capilar os produtos de PCR são separados e a fluorescência é captada por fotocélulas tornando possível a separação por tamanho dos fragmentos obtidos. Essa metodologia é chamada de análise de tamanho de fragmentos e, em geral a eletroforese acontece em capilares em sequenciador de DNA (FIGURA 3).

Sequências STRs compostas por 2 pb (pares de base) até 10 pb são também chamadas de microssatélites, muito utilizados para identificação humana por serem facilmente amplificadas por PCR, principalmente as repetições de tetranucleotídeos que são as mais populares para identificação humana (BUTLER, 2010).

A amplificação por PCR é uma importante ferramenta para fins diagnósticos que permite a amplificação *in vitro* do DNA em um sistema autoamatizado fechado. Cada ciclo da PCR é constituído por três etapas: (i) desnaturação (+/- 95°C), (ii) hibridação (55°C- 65°C) e (iii) extensão (72°C). A desnaturação separa as fitas de DNA que serão utilizadas como molde para os demais processos. A hibridação é a fase na qual os iniciadores (*primers*) se ligam às fitas simples das sequências alvo e a fase de extensão é aquela na qual a DNA polimerase sintetiza uma nova fita de DNA a partir da fita molde (JOSHI *et al*, 2010).

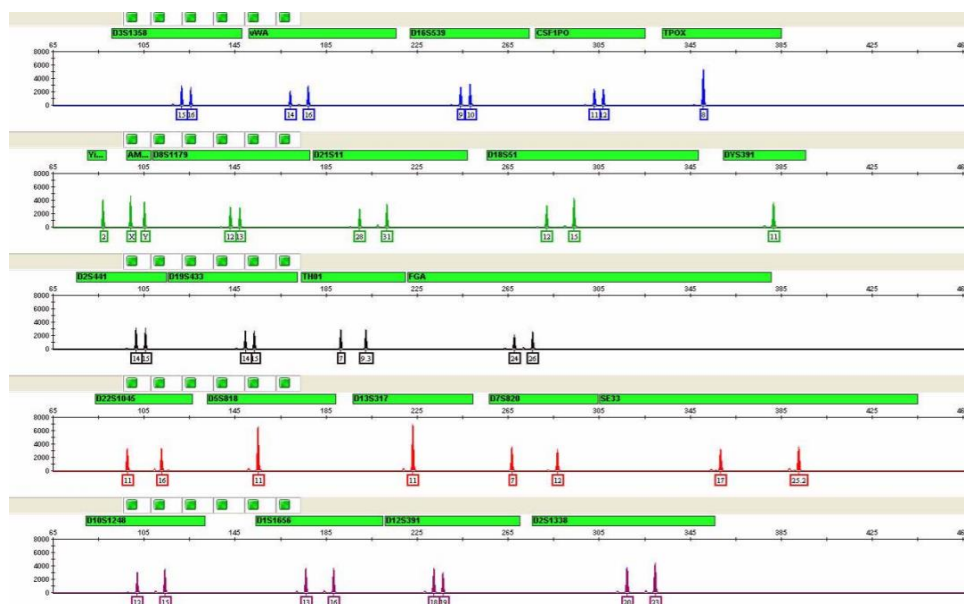
Para fins de identificação humana forense há diversos sistemas comerciais disponíveis no mercado, como por exemplo, o GlobalFiler™ que é composto por *primers* específicos que hibridizam às sequências a fim de que sejam formadas inúmeras cópias da sequência específica de DNA em um curto período de tempo, formando um número de sequências de DNA necessário para a detecção em equipamentos de sequenciamento e genotipagem de material genético (GOUVEIA, 2015).

FIGURA 2 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA UTILIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DE TAMANHO VARIADO PREPARADAS EM *SOUTHERN BLOTS* PARA OBTENÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS



Legenda: Técnica *Southern blot*, em que o DNA era clivado com enzimas de restrição específicas e hibridizadas com sondas para locos específicos. Como os indivíduos podem possuir diferentes números de repetições nos locos analisados, estes fragmentos com tamanhos diferentes migrarão com velocidades diferentes no gel e serão revelados pelas sondas específicas para cada loco. Pode-se perceber que o perfil difere para cada um dos indivíduos testados. **Fonte:** SNUSTAD et. al., 2012.

FIGURA 3 - PERFIL GENÉTICO OBTIDO ATRAVÉS DA ELETROFORESE CAPILAR



Legenda: Exemplo de um perfil masculino obtido com eletroforese capilar sendo analisado no *software* GeneMapper. Nesta técnica, são utilizados *primers* conjugados à fluorescências que

amplificam os segmentos de interesse, e através de eletroforese capilar os produtos de PCR são separados e a fluorescência é captada por fotocélulas tornando possível a separação por tamanho dos fragmentos obtidos. FONTE: APPLIED BIOSYSTEMS (2016).

2.3 PCR EM TEMPO REAL

A PCR em tempo real (rt-PCR), foi descrita pela primeira vez por Higuchi e colaboradores, em 1993. A técnica da época, consistia no monitoramento contínuo de todos os ciclos de PCR por uma câmera capaz de detectar o aumento progressivo de fluorescência de brometo de etídio relacionada com o aumento do número de cópias de DNA.

Atualmente outros compostos químicos fluorescentes são utilizados. O monitoramento da fluorescência é realizado através de um computador ligado ao equipamento e a excitação da fluorescência é realizada por um *laser*. Existem duas categorias de rt-PCR, no presente trabalho será abordado o método de sondas de hidrólise (*Sondas TaqMan®*). A sonda possui um fluoróforo *reporter* na extremidade 5' e um *quencher*, um grupo químico que suprime a fluorescência do *reporter*, na extremidade 3'. O objetivo da PCR em tempo real neste trabalho é quantificar o DNA das amostras analisadas na rotina forense.

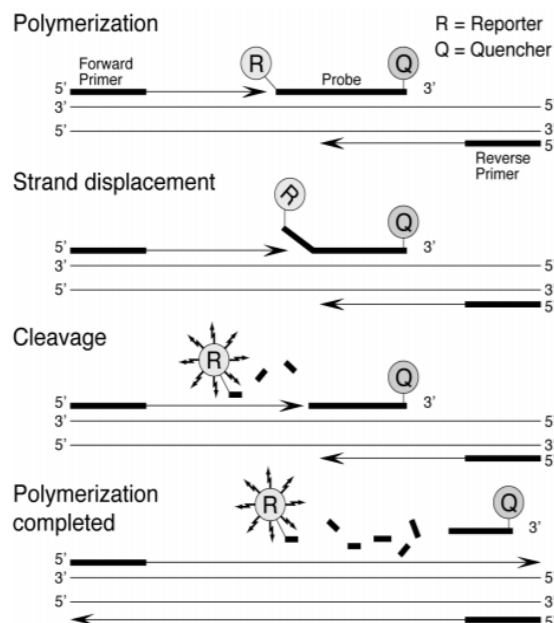
As sondas possuem sequência específica de DNA que anelam de forma exclusiva na sequência alvo definida por um par de *primers*. A base do funcionamento das sondas (FIGURA 4) é a atividade no sentido 5'-3' da DNA polimerase. Quando a sequência alvo está presente na reação, a sonda anela entre o par de *primers* direto e reverso, e é clivada pela enzima DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula *reporter* liberando fluorescência detectável.

PowerQuant® System é um sistema comercial utilizado para a quantificação de DNA no equipamento de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System e realizando as análises das curvas padrão (com diluições seriadas de DNA controle conhecido) no *Software* Applied Biosystems® 7500 Software, Versão 2.0.6.

O sistema PowerQuant® possui cinco fluorescências e quatro alvos para sondas de hidrólise, que amplificam alvos multicópias para quantificar especificamente o DNA humano, além de detectar a presença de DNA masculino presentes em determinada amostra. O sistema possui um controle interno (IPC, do

inglês *Internal PCR Control*) detecta a presença de inibidores da reação e também amplifica um alvo que identifica possíveis degradações do DNA. (PROMEGA, 2018)

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DA Sonda DE HIDRÓLISE (*TaqMan®*).



LEGENDA: A sonda possui uma sequência que anela especificamente na sequência alvo. A sonda é composta por um fluoróforo *reporter* na extremidade 5' e um *quencher*, um grupo químico que suprime a fluorescência do *reporter*, na extremidade 3'. A sonda é clivada pela DNA polimerase, separando *quencher* do *repórter* que terá a fluorescência detectável. FONTE: THERMOFISHER Scientific (2018).

2.4 GLOBALFILER™

O conjunto comercial GlobalFiler™ (ThermoFisher Scientific) é composto por seis corantes fluorescentes e permite a amplificação simultânea, em uma única reação de PCR, de 21 STRs autossômicos, 1 STR de cromossomo Y, 1 Y *indel*, além do gene da amelogenina, totalizando 24 marcadores genéticos distintos. Os fluoróforos utilizados no kit são o FAM™ com a cor azul, VIC™ em verde, NED™ em amarelo, TAZ™ em vermelho, SID™ em roxo e a cor alaranjada com o fluoróforo LIZ™ para o marcador interno GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016).

Os 21 locos STRs autossômicos amplificados com o conjunto comercial, são: D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338. O loco STR de cromossomo Y, é DYS391, o Y *indel*

é um marcador polimórfico de inserção/ deleção no cromossomo Y. E o gene da amelogenina é um marcador de determinação de sexo.

2.5 BANCOS DE DADOS DE PERFIS GENÉTICOS

O *Combined DNA Index System*, ou CODIS, é uma rede tecnológica do laboratório do FBI (*Federal Bureau of Investigation*) que passou a operar em 1998. O CODIS é uma base de perfis genéticos mundial, com o objetivo de confrontar vestígios encontrados em cenas de crime, possibilitando comparações dos perfis genéticos obtidos entre os laboratórios. 50 países utilizam o *software* CODIS com seus respectivos bancos de dados.

A Rede Integrada de Banco de Perfil Genético, tem como objetivo, o intercâmbio de perfis genéticos de interesse da Justiça no Brasil. Os vestígios são oriundos de cenas de crime ou retirados do corpo de vítimas de violência sexual. Além do confronto entre vestígios, ocorre o confronto dos vestígios com os condenados por crimes hediondos inseridos no banco, cumprindo a Lei nº 12.654, de 28 de maio de 2012 (RIBPG, 2015).

Dentre os 21 marcadores autossômicos do GlobalFiler™, 19 correspondem aos locos inclusos no CODIS. Para inserção no banco de dados RIBPG, são necessários no mínimo 9 locos CODIS, e por essa razão é um sistema comercial que atende as necessidades do LGMF. Além disso, o GlobalFiler™ engloba marcadores para 10 regiões mini-STR de tamanho menor que 220 pb maximizando a amplificação de amostras muito degradadas.

2.6 ANÁLISE DE DNA E DEGRADAÇÃO

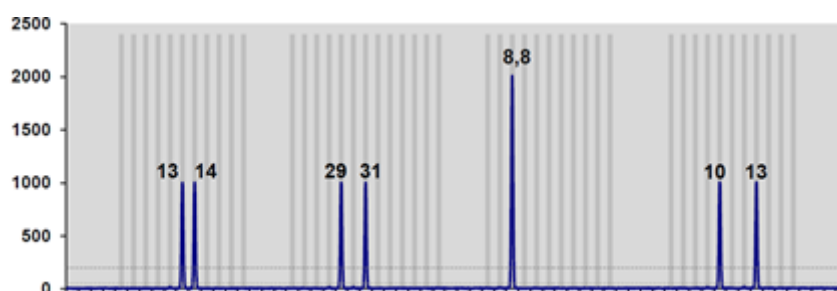
Degradação do DNA é a destruição e fragmentação da molécula ao ser exposta à fatores físicos, como radiação solar e biológicos, como enzimas produzidas por fungos e bactérias que proliferam na matéria orgânica em decomposição. A degradação resulta em mudanças estruturais da molécula de

DNA, mudanças que inviabilizam o anelamento dos *primers* e, consequentemente, o funcionamento da DNA polimerase (SILVA *et al*, 2006; GOUVEIA, 2015).

Os vestígios de cenas de crime, devem ser cuidadosamente manuseados, de maneira que se evite a degradação resultante da exposição prolongada das matérias biológicas e contaminação das amostras. Por contaminação entende-se, a mistura de material genético do perito que manuseia as amostras com o material genético encontrado na cena de crime, por exemplo (SILVA & PASSOS, 2006).

Após a extração do DNA, os alelos são amplificados através de reações de PCR e analisados com eletroforese capilar. A FIGURA 5 representa um exemplo de perfil parcial que é obtido a partir da genotipagem com quantidade ideal de DNA. Pode-se observar neste exemplo, os alelos de 4 locos, os locos heterozigotos com dois alelos apresentando picos de mesmo tamanho, e loco homozigoto com um pico de altura compatível ao dobro dos picos dos alelos em locos heterozigoto. Tanto o alelo de origem materna quanto o de origem paterna devem ser amplificados com a mesma proporção e podem estar em homozigose ou heterozigose (BUTLER, 2015). A interpretação de resultados genéticos se baseia na comparação do genótipo da amostra evidência (cuja origem é de fonte desconhecida) com uma ou mais amostras padrão (cuja origem é de fonte conhecida) (RAKAY *et al*, 2012).

FIGURA 5 - PERFIL PARCIAL, DEMONSTRANDO UM BALANÇO PERFEITO ENTRE ALTURAS DOS PICOS



LEGENDA: Pode-se observar neste exemplo, os alelos de 4 locos, os locos heterozigotos com dois alelos apresentando picos de mesmo tamanho, e loco homozigoto com um pico de altura compatível ao dobro dos picos dos alelos em locos heterozigoto. FONTE: BUTLER (2015).

Ao se analisar o eletroferograma de uma amostra degradada, pode-se observar a perda de locos gênicos, perdas alélicas (*drop-out*), desbalanço nas alturas de picos e ocorrência de artefatos de PCR, tais como bandas *stutter*, situações com potencial para mascarar picos próximos levando a resultados inadequados (BALDING *et al*, 2009). O *stutter* ocorre durante a amplificação por

PCR dos STRs, os produtos de *stutter* são *amplicons* (produtos de PCR) que apresentam uma unidade a menos do que o alelo verdadeiro, resultado de um deslize da enzima DNA polimerase. (BUTLER, 2012).

Como resultado de baixas concentrações (menos que 100pg) de DNA em amostras, pode ocorrer o *drop-out* dificultando ou impossibilitando a análise podendo levar a uma falsa homozigose em que a amplificação preferencial deixa de detectar um dos alelos podendo excluir um suspeito de um crime, por exemplo (BUTLER, 2012). Para estimar os valores de limiares de perdas alélicas, pode-se induzir *drop-outs* a partir de diluições seriadas (HANED et al., 2011).

A probabilidade de *drop-out* é dependente do tamanho do produto amplificado. Os alelos que apresentam maior número de repetições STRs são mais afetados pela degradação do que aqueles com repetições menos numerosas. Os estudos estocásticos são utilizados para formular as probabilidades de *drop-out* (BALDING et al, 2009).

O estudo de sensibilidade é utilizado para determinar o alcance dinâmico do sistema de amplificação, assim como o limite de detecção, balanço de heterozigose e detecção do ruído de equipamento. A obtenção destes limiares é importante também para auxiliar na análise de genótipos que apresentam excessivos efeitos estocásticos resultantes de amostras com pouca quantidade de DNA e/ou baixa qualidade da amostra ou com *drop-out* (SWGDAM, 2012).

2.7 QUALITY ASSURANCE STANDARDS

O *Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories* (QAS) é um documento que passou a ser efetivo em setembro de 2011 e consiste em definições e padrões que devem ser seguidos por laboratórios de genética molecular forense para garantir a qualidade e integridade dos dados gerados (FBI, 2000).

O QAS é um documento que estabelece diretrizes para validação interna. Uma série de pesquisas são definidas por tal documento, tais como estudos de sensibilidade estocástico, de reprodutibilidade, de precisão, de mistura e de contaminação (QAS, 2011).

Após a data de efetivação do documento, que ocorreu em 2011, o QAS definiu passos necessários para um estudo de validação interna que devem ser aplicados, se possível. Dentre as diretrizes do QAS, para uma validação interna, as amostras a serem utilizadas devem ser não-probatórias e conhecidas, deve-se realizar estudos de sensibilidade, estocástico, além de, na norma 8.3.1, afirmar que um estudo de validação interna em um laboratório deve ser documentado.

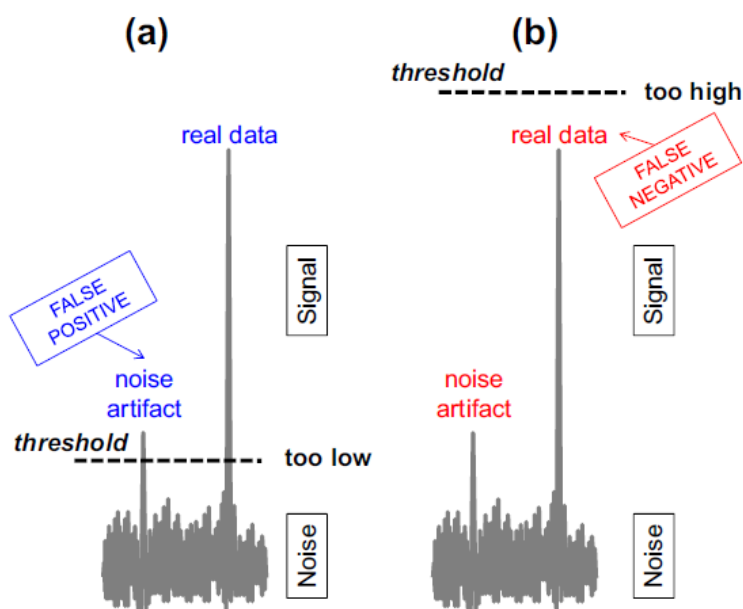
2.8 VALIDAÇÃO INTERNA

Padronizar um limiar analítico (AT, do inglês, *Analytical Threshold*) é um dos passos para a validação interna e tem por finalidade determinar os limites de detecção para a otimização de procedimentos laboratoriais. Para isso, é necessário determinar o sinal mínimo que distingue os alelos reais dos ruídos de equipamento ou artefatos de PCR, muito comum em amostras com pouca concentração de DNA em que serão formados picos de menores tamanhos. O limiar analítico é o valor gerado para definir a altura dos picos RFU (unidades de fluorescência relativas, do inglês, *relative fluorescence units*) capaz de separar, de maneira segura, os picos reais de DNA presente na amostra dos sinais de ruído do equipamento (FIGURA 6) (BREGU *et al*, 2013)

Uma validação interna deve ser realizada para definir parâmetros e padrões de qualidade de interpretações de resultados. A partir dessa validação, é possível determinar, objetivamente, os valores de limiares para *stutter*, amplitude de picos e de limiares basais, além de limiares de altura dos picos em homozigose e heterozigose que devem ser determinados para interpretação correta dos dados (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016).

O estudo de validação interna tem como propósito avaliar, documentar e compreender as variações dos resultados obtidos em um laboratório, sendo essenciais para estabelecer parâmetros utilizados na interpretação de dados obtidos a partir da genotipagem de amostras evidências e padrões em um caso criminal. O objetivo principal de definir um limite de detecção de picos de fluorescência, é a exclusão de dados inconsistentes para que sejam analisados apenas os dados viáveis (BUTLER, 2015).

FIGURA 6 –EFEITOS DE VALORES DE LIMIAR ANALÍTICO PARA VALORES DE RFU



LEGENDA: a) Limiar analítico (AT) definido com valor muito baixo, não distinguindo os ruídos de equipamento, gerando dados falso-positivos; b) Valor de AT muito elevado, resultando em dados falso-negativos. FONTE: BUTLER (2015).

2.9 OBJETIVOS

2.9.1 OBJETIVOS GERAIS

Entendendo-se a importância da padronização, para que exista conformidade, consistência e acurácia entre as análises e interpretações de resultados pelos peritos criminais, faz-se necessário uma validação interna realizada através de um estudo analítico, estocástico e de sensibilidade (SWGDM, 2010).

Cada kit de amplificação STR, gera variações que dependem das condições de cada laboratório. O presente trabalho tem por objetivo determinar limiares internos de interpretação analítica para o sistema comercial GlobalFiler™, de modo a fixar valores objetivos para auxílio na interpretação dos resultados de exames de DNA realizados no LGMF, principalmente em amostras com baixa quantidade de DNA.

2.9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar internamente o sistema comercial GlobalFiler™ para amplificação de STRs autossômicos;
- Determinar limiares de interpretação analítica que reflitam as condições empíricas de análise de perfis genéticos gerados no LGMF.
- Contribuir para a garantia da qualidade dos resultados gerados pelo Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística do Paraná.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS

Três amostras (001, 002 e 2800) não-probatórias foram utilizadas para a realização da validação interna. Para fins de cálculos comparativos entre os resultados de AT, foram utilizados os dados obtidos da análise de 43 amostras brancas (controle negativo) de corridas anteriormente realizadas com o GlobalFiler™ na rotina do LGMF.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A quantificação do DNA foi feita por PCR em tempo real e realizada no equipamento 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) com o conjunto comercial PowerQuant® System (Promega®) utilizando os protocolos do fabricante. Ao quantificar as amostras, pode-se avaliar, entre outras análises, a quantidade de DNA, a presença de DNA degradado, a origem da amostra (de um indivíduo do sexo masculino ou feminino) (GOUVEIA, 2015).

Quando a amostra contém muito DNA, deve ser diluída para que tenha a quantidade ideal para a eletroforese capilar. Ao se adicionar muito DNA em uma PCR, a intensidade da fluorescência excede a linearidade dinâmica do instrumento de genotipagem (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016).

Com a finalidade de refletir a situação real da rotina do LGMF que recebe uma grande diversidade de amostragem com variadas concentrações de DNA, as três amostras utilizadas para o cálculo de AT foram quantificadas e diluídas para todas estarem com 2 ng de DNA, e a partir de 2 ng, outros sete pontos de diluições seriadas foram realizados.

3.3 AMPLIFICAÇÃO

Cada uma das três amostras foi diluída em água ultrapura, gerando amostras com oito concentrações distintas: 2,0 ng, 1,0 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,125 ng, 0,0625 ng, 0,031 ng e 0,015625 ng. A amplificação foi realizada utilizando o conjunto comercial de amplificação GlobalFiler™ seguindo o protocolo preconizado pelo fabricante em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems): 95°C por 1 minuto (tempo de incubação); 30 ciclos de desnaturação e anelamento (94°C por 10 segundos e 59°C por 90 segundos), extensão à 60°C por 10 minutos e finaliza com 4°C. Os controles negativos e positivos também foram amplificados.

Foram coletados os dados de 43 amostras de controles negativos corridas nos primeiros meses de utilização do *kit* GlobalFiler™ para métodos comparativos adicionais do limiar analítico.

3.4 ELETROFORESE CAPILAR

As amostras amplificadas foram submetidas a separação eletroforética em sequenciador de DNA ABI PRISM® 3500 Genetic Analyser com a matriz DS-36 (ThermoFisher Scientific) e auxílio do *Software* Gene Mapper ID-X 1.4 (Applied Biosystems®).

Cada uma das diluições das amostras foi analisada em triplicata. Junto com 2 µL de cada amostra amplificada, foram adicionados 9,7 µL de formamida deionizada (HiDi) e 0,3 µL GeneScan™-600 LIZ® Size Standard (ThermoFisher Scientific). O volume de *ladder* adicionado à mistura de HiDi com *size* é de 1,5 µL. As amostras foram colocadas por 3 minutos no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) à 95°C para desnaturação das fitas e então colocadas no equipamento de eletroforese capilar.

Após a eletroforese capilar, utilizando o *Software* Gene Mapper ID-X 1.4 (Applied Biosystems®) alguns parâmetros devem ser modificados para que seja realizado a análise e cálculos analíticos. É possível editar os métodos de análise clicando em “Tools” e “GeneMapper® ID-X Manager”, dentro do editor de métodos para análise, existe a aba de detecção de picos (“Peak detector”) onde o *threshold* de todos os parâmetros foi definido como 1 e em “Peak quality” a opção de detecção automática de *stutter* foi desabilitada.

3.5 MÉTODO PARA DETERMINAR O LIMAR ANALÍTICO

Para calcular o limiar analítico, foram analisados os dados obtidos no sequenciador de eletroforese capilar ABI PRISM® 3500 Genetic Analyser exportados do *software* Gene Mapper ID-X 1.4 para a planilha Microsoft Excel 2016. O método utilizado para o cálculo do limiar analítico foi realizado com o auxílio do artigo de Kaiser (1970).

As três amostras conhecidas e não-probatórias foram quantificadas. Sendo conhecidas as suas concentrações, as amostras foram diluídas em oito pontos: 2,0 ng, 1,0 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,125 ng, 0,0625 ng, 0,031 ng e 0,015625 ng. Os pontos de diluição foram para o sequenciador na placa de 96 poços (Applied Biosystems® - MicroAmp® *Optical 96-Well Reaction Plate*) em triplicata.

As amostras foram sequenciadas e, com o auxílio do *Softwares* GeneMapper ID-X 1.4 (Applied Biosystems®), os dados foram coletados. Para a análise no Gene Mapper ID-X 1.4, os *thresholds* de RFU foram definidos para 1 e as detecções automáticas de picos e *stutters* foram desativadas. A média e desvio padrão foram calculados a partir dos dados da tabela de genótipos exportados para o Microsoft Excel 2016, para a substituição na seguinte equação:

$$AT = Y_{bl} + k s_{Y;bl}$$

AT = representa o *Analytical Threshold*, ou limiar analítico.

Y_{bl} = é a média de altura dos picos.

$s_{Y;bl}$ = é o valor do desvio padrão.

k = fator numérico representando o nível de confiança.

O cálculo foi realizado separadamente para cada um dos 5 canais de fluorescência, porque cada canal se comporta de maneira diferente. O valor de k utilizado foi igual a 3 por ser o valor que se obteve maior concordância entre

diversos autores (KAISER, 1970) para que os dados obtidos representassem o ruído basal do equipamento, de acordo com a descrição.

4 RESULTADOS

Os valores dos limiares analíticos dão suporte aos peritos para as análises dos perfis genéticos principalmente no caso de amostras com o material genético muito degradado ou em baixa quantidade, sendo os valores variáveis de laboratório para laboratório.

Os resultados dos valores de AT obtidos com o presente trabalho podem ser observados nas FIGURA 7, através de valores de alturas de picos de RFU. Os valores de AT, representam o limiar a partir do qual os picos são considerados reais e não apenas ruídos de PCR.

FIGURA 7 - RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE LIMIARES ANALÍTICOS

a)	Canal de Fluorescência	Resultados AT - Diluições	b)	Canal de Fluorescência	Resultados AT - C. negativo
	SID™	58,77 RFU		SID™	24,7 RFU
	6-FAM™	55,01 RFU		6-FAM™	20,21 RFU
	VIC™	65,96 RFU		VIC™	29,21 RFU
	NED™	49,18 RFU		NED™	21,63 RFU
	TAZ™	55,47 RFU		TAZ™	21,92 RFU

LEGENDA: Os valores de AT representam as alturas mínimas detectáveis dos picos de fluorescência, picos de altura menor do que os valores de AT, não são considerados picos reais de DNA. a) AT calculado utilizando as diluições contendo DNA. Cálculos realizados separadamente para cada um dos canais de fluorescência. b) Resultados de AT à partir dos dados de controles negativos, realizados separadamente para cada fluorescência. FONTE: A autora (2018).

O ponto de diluição com 2 ng de DNA possui concentração superior à desejável pelas especificações do GlobalFiler™ que foi validado para ser usado com amostras contendo 0,5ng de DNA em uma PCR de 30 ciclos. Portanto, foi retirado o ponto de 2ng para perceber possíveis diferenças nos valores de AT calculados. O resultado obtido (FIGURA 8), demonstra que a variação gerada nos cálculos de AT tem relação também com a concentração de DNA na amostra, corroborando com as informações contidas no livro de Butler (2015).

FIGURA 7 – VALORES DE AT CALCULADO EXCLUINDO OS DADOS DOS PONTOS MAIS CONCENTRADOS

Canal de Fluorescência	Resultados AT - Diluições (sem o ponto de 2 ng)
SID™	42,18 RFU
6-FAM™	38,12 RFU
VIC™	46,65 RFU
NED™	36,06 RFU
TAZ™	40,86 RFU

FONTE: A autora (2018).

5 CONCLUSÕES

O método de cálculo para limiar analítico, comparou duas fontes diferentes de dados: uma com amostras contendo DNA em diluição seriada, e outra com os controles negativos.

Os valores de AT ficaram muito baixos com a análise a partir de controles negativos, não sendo apropriada a utilização destes valores de AT em amostras que apresentem quantidade significativa de sinal RFU, porque o sinal da linha de base para as amostras de controles negativos não é representativo para as amostras contendo DNA. Porém, os valores de AT calculados com os controles negativos possui importância para as análises de amostras com baixas concentrações de material genético, resultado que corrobora com o mostrado no artigo de Bregu (2013).

Um outro ponto importante a ser observado, é a variação que a concentração de DNA gera na análise do cálculo de AT. Por essa razão, há a necessidade de precisão dos aparelhos de quantificação por PCR em tempo real, para que sejam confiáveis os resultados de concentração de DNA das amostras extraídas do laboratório, a fim de se estabelecer um limiar analítico que seja representativo aos

sinais de RFU mais comumente observados no dia a dia do trabalho no laboratório. Assim como descrito no livro de Butler (2015), foi possível obter como resultado, que diferentes concentrações de DNA geram diferentes níveis de sinais linha de base, o que foi observado através da diferença no valor de AT nos cálculos com e sem os pontos de 2 ng de material genético.

Portanto, recomenda-se a utilização na rotina do laboratório, os valores de AT obtidos com a curva de diluição sem o ponto mais concentrado (FIGURA 7), porque reflete de maneira mais similar, a rotina dentro do LGMF, em que as amostras são diluídas ao ponto de estarem dentro da concentração ideal de DNA. Picos com altura inferior aos valores de AT obtidos no presente trabalho devem ser desconsiderados na análise dos eletroferogramas.

Atualmente, os *softwares* de análise permitem a aplicação de um limiar de detecção único para todo o eletroferograma, porém, assim como foi demonstrado no presente trabalho, a sensibilidade e as linhas de base variam entre os canais de fluorescência.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

APPLIED BIOSYSTEMS. **GlobalFiler™ PCR AMPLIFICATION KIT - User Guide**. Thermo Fisher Scientific Inc. Life Technologies Corporation, Carlsbad, 2016.

BALDING, D. J.; BUCKLETON, J. Interpreting low template DNA profiles. Elsevier, **Forensic Science International: Genetics**, v. 4, p. 1–10, 2009.

BREGU, J.; CONKLIN, D.; CORONADO, E.; TERRILL, M.; COTTON, R. W. GREGOR, C. M. Analytical Thresholds and Sensitivity: Establishing RFU Thresholds for Forensic DNA Analysis. **Journal of Forensic Sciences**. vol. 58, n. 1. jan. 2013.

BUTLER, J.M. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. **J. Forensic Sci.** v. 51, n. 2, p. 253–265, mar. 2006.

BUTLER, J.M. **Fundamentals of Forensic DNA Typing**. Elsevier, p.3-13, 2010.

BUTLER, J. M. **Advanced Topic in Forensic DNA Typing: Interpretation**. San Diego: Elsevier, 2015.

BUTLER, J. M. **Advanced Topic in Forensic DNA Typing: Methodology**. Academic Press. Ed. 1, p. 142-144, San Diego: Elsevier, 2011.

CORTE-REAL, F.; VIEIRA, D. N. **Princípios da Genética Forense**. Coimbra: Coimbra University Press, 2015.

DAHLM, R. **Friedrich Miescher and the discovery of DNA**. Developmental Biology. Elsevier, p. 274-288, 2004.

DUNDAS, N.; LEOS, N. C.; MITUI, M.; REVELL, P.; ROGERS, B. B. Comparison of Automated Nucleic Acid Extraction Methods with Manual Extraction. **Journal of Molecular Diagnostics**, Dallas, TX, v. 10, n. 4, jul. 2008.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, 1986.

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION. "Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories" e "Quality Assurance Standards for Convicted Offender DNA Databasing Laboratories", **Forensic Science Communications**, v. 2, n. 3, Jul, 2000.

FLORES, S.; SUN, J.; KING, J.; BUDOWLE, B. **Internal validation of the GlobalFiler™ Express PCR Amplification Kit for the direct amplification of reference DNA samples on a high-throughput automated workflow**. Forensic Science International: Genetics, 10, 33-39. Elsevier, Ireland Ltd, 2014.

FRANCISCHINI, C.W.; SUMITA, D.R.; WHITTLE, M.R. Desenvolvimento de um sistema triplex em PCR em tempo real para quantificação de DNA humano em amostras forenses. **Saúde, Ética & Justiça**, São Paulo, v. 18 (Ed. Especial), p. 72-78, mai. 2013.

GILL, P.; BUCKLETON, J. **Biological Basis for DNA Evidence**. CRC Press.

GOODWIN, W.; LINACRE, A.; HADI, S. An Introduction to forensic genetics. **John Wiley & Sons, Ltd**. p.1-4, 2007.

GOUVEIA, N. B. M. **Validação e implementação do kit Quantifiler Trio DNA Quantification em amostras forenses**. 31pg Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) - Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, 2015.

HANED, H.; EGELAND, T.; PONTIER, D.; PE`NE C, L.; GILL, P. Estimating drop-out probabilities in forensic DNA samples: A simulation approach to evaluate different models. Elsevier, **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, p. 525–531, 2011.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. **Nature Publishing Group**. Bio/Technology, v. 11, set, 1993.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. **Nature**, v. 316, p. 76-79, 1985.

JOSHI, M.; DESHPANDE J.D. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. **International Journal of Biomedical Research**. pg. 81-97. Índia, 2010.

KAISER, H. Quantitation in Elemental Analysis. Part II. **Analytical Chemistry**, v. 42, n. 4, Georgia, apr., 1970.

PROMEGA. **Technical Manual PowerQuant® System**. Instructions for Use of Products PQ5002 and PQ5008. Madison, WI, 2018.

RAKAY, C. A.; BREGU, J.; GRGICAK, C. M. Maximizing allele detection: Effects of analytical threshold and DNA levels on rates of allele and locus drop-out. Elsevier, **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, p. 723–728, 2012.

SANGER, F.; COULSON, A. R. Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. **Journal of Molecular Biology**. v. 94, p. 441-448, Cambridge, 1975.

SILVA, L. A. F.; PASOS, N. S. **DNA Forense**: Coleta de Amostras Biológicas em Locais de Crime para Estudo do DNA. Edufal, ed. 2, Maceió, 2006.

SNUSTAD D.P.; SIMMONS, M.J. **Principles of Genetics**. John Wiley & Sons. ed. 6, p.113, cap.6, 2012.

STEFFEN, B.; VALLONE, P.; ROMSOS, E.; COBLE, M. **Countdown to 2017: Internal Validation of the New CODIS Loci**. In: INTERNAL VALIDATION OF THE NEW CODIS LOCI, 26., 2015, Grapevine, TX. **Annual International Symposium on Human Identification**, out., 2015. p. 21-30.

SWGDM. Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories. **Scientific Working Group on DNA Analysis Methods**, 2010.

SWGDM. Validation Guidelines for DNA Analysis Methods. **Scientific Working Group on DNA Analysis Methods**, 2012.

THERMOFISHER Scientific. **Essentials of Real-Time PCR**. Disponível em: <<http://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html.html>> Acesso em: 18 jun. 2018.

VARUZZA, L. **Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração - Versão 2.0.1**. Abr, 2013.

WAMBAUGH, J. **The Blooding**. Bantam Books, New York, 1989.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids - A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738. Cambridge, 1953.